

Rec'd PCT/PTO

28 SEP 2004
PCT/JP03/03975

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

28.03.03

10/509343

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月29日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-096038

[ST.10/C]:

[JP2002-096038]

REC'D 23 MAY 2003

WIPO PCT

出 願 人

Applicant(s):

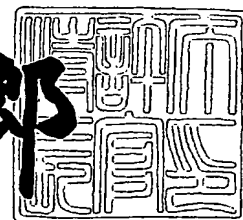
中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 9日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3033424

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-A0206

【提出日】 平成14年 3月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 7/01

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社
社内

 【氏名】 斎藤 良一

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会
社内

 【氏名】 大友 俊彦

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会
社内

 【氏名】 土屋 政幸

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランスポーター阻害物質スクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 トランスポーターをコードする遺伝子を含む組換えウイルスを感染させた宿主を培養し、該宿主から放出される出芽ウイルス膜上にトランスポーターを発現させることを特徴とする、トランスポーター活性を有するトランスポーターを発現させる方法。

【請求項 2】 ウイルスがバキュロウイルスである請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 トランスポーターが非ウイルス由来である請求項 1 または 2 いずれか記載の方法。

【請求項 4】 トランスポーターがペプチドトランスポーターである請求項 1 ～ 3 いずれか記載の方法。

【請求項 5】 ペプチドトランスポーターがPepT1又はPepT2である請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】 トランスポーター活性を有するトランスポーターを発現して、ウイルス。

【請求項 7】 トランスポーターが非ウイルス由来である請求項 6 記載のウイルス。

【請求項 8】 ウイルスがバキュロウイルスである請求項 7 記載のウイルス。

【請求項 9】 ウイルスが出芽ウイルスである、請求項 6 ～ 8 いずれか記載のウイルス。

【請求項 10】 トランスポーターがペプチドトランスポーターである請求項 6 ～ 9 いずれか記載のウイルス。

【請求項 11】 ペプチドトランスポーターがPepT1又はPepT2である請求項 10 記載のウイルス。

【請求項 12】 ウイルス膜上でトランスポーターを発現させることを特徴とする、トランスポーターの活性測定方法。

【請求項 13】 ウイルスが出芽バキュロウイルスである請求項 12 記載の

方法。

【請求項 1 4】 トランスポーターがペプチドトランスポーターである請求項 1 2 または 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】 トランスポーターがPepT1又はPepT2である請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】 以下の工程を含むトランスポーターのトランスポート活性を阻害又は促進する物質のスクリーニング方法。

- (a) ウイルス膜上にトランスポーターを発現させる工程、
- (b) 該トランスポーターに被験物質を接触させる工程、及び
- (c) トランスポート活性を阻害又は促進する物質を選択する工程

【請求項 1 7】 ウイルスがバキュロウイルスである請求項 1 6 記載の方法

【請求項 1 8】 ウイルスが出芽ウイルスである請求項 1 6 又は 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】 トランスポーターが非ウイルス由来である請求項 1 6 ~ 1 8 いずれか記載の方法。

【請求項 2 0】 トランスポーターがペプチドトランスポーターである、請求項 1 6 ~ 1 9 いずれか記載の方法。

【請求項 2 1】 ペプチドトランスポーターがPepT1又はPepT2である、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】 ウイルスが担体に固定されていることを特徴とする請求項 1 6 ~ 2 1 いずれか記載の方法。

【請求項 2 3】 ウイルスの担体への固定が、ウイルス膜上に発現している膜タンパク質に対する抗体を介して行われていることを特徴とする請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】 ウイルスの担体への固定が、ウイルス膜上に発現しているタンパク質をビオチン化することでビオチン・ストレプトアビジン反応を介して行われることを特徴とする請求項 2 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はトランスポーターをコードする遺伝子を用いて出芽ウイルス膜上にトランスポーターを発現させることを特徴とする、トランスポーター活性を有するトランスポーターを発現させる方法に関する。また、本発明はトランスポーター活性を有するトランスポーターを発現しているウイルス、該ウイルスを用いたトランスポーターの活性測定法、及び、トランスポーターのトランスポート活性を阻害または促進する物質のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

哺乳動物は、生体外から栄養源を取り込む必要性があり、細胞には多くの輸送タンパク質（トランスポーター）が存在することが知られている。このようなトランスポーターは主として生命維持に必須の物質（アミノ酸や糖等）を細胞内に輸送する働きを有する。生理的環境下では同一基質を輸送するトランスポーターが細胞に複数存在することが多い。このような場合、キネティクス解析（ K_m 、 V_{max} などの算出；例えば、Wright E.M., Am.J.Physiol.Renal Physiol. 280: F10-18 (2001)参照）により細胞への取り込みに対するそれぞれのトランスポーターの寄与が推定できる。従って、トランスポーターの輸送基質を同定し、キネティクス解析をすることは、その生理機能ならびに薬物送達の可能性を明らかにする上で極めて重要である。

【0003】

現在、トランスポーターの機能解析には、(1)生体から単離したトランスポーターを含む初代培養細胞、及び細胞膜小胞（肝細胞、刷子縁膜小胞など）、(2)トランスポーターを含む癌細胞などからライン化された細胞株（Caco-2細胞など）、(3)トランスポーターの遺伝子を導入した哺乳類細胞（LLC-PK1細胞、MDCK細胞など）やアフリカツメガエル卵母細胞、並びに(4)バキュロウイルス発現系を用いてトランスポーターを発現させた昆虫細胞膜（Sf9細胞膜など）を材料として用いる方法が挙げられる。中でも、哺乳類細胞やアフリカツメガエル卵母細胞の遺伝子発現系が主に用いられている。しかし、トランスポーター遺伝子を導入した哺乳

類細胞やアフリカツメガエル卵母細胞でも内因性トランスポーターに由来する活性が検出され、バックグラウンドが高くなる (Kanai Y. et al., J.Clin.Invest. 93: 397-404 (1994); Kekuda R. et al., J.Biol.Chem. 271: 18657-18661 (1996); Kekuda R. et al., Am.J.Physiol. 272: G1463-1472 (1997); Yabuuchi H. et al., J.Pharmacol.Exp.Ther. 286: 1391-1396 (1998); Hatanaka T. et al., J.Clin.Invest. 107: 1035-1043 (2001))。そのため、トランスポーターの種類によっては、遺伝子を導入していない細胞(親株)と導入した細胞との活性比が2倍程度しかないものも報告される。このように活性比の低い遺伝子導入細胞では、キネティクス解析を行うことは困難である。

【0004】

また、トランスポーター遺伝子を注入したアフリカツメガエル卵母細胞では電気生理学的手法によりトランスポーター活性を測定できる。NaやHイオンを駆動力にするトランスポーターならびに生理的pHで電荷を有する基質の場合、基質の輸送により生じる電流を測定することでトランスポーター活性が検出できる。しかし、駆動力がなく、且つ、生理的pHで電位的に中性な基質では、輸送活性を測定することは困難である。また、トランスポーター活性が認められたが弱い電流しか検出できない場合、キネティクス解析は困難である。また、電気生理学的手法には特殊な機器を使用するため、簡便性に欠ける。

【0005】

薬物を細胞内へ移送するトランスポーターの活性や基質特異性は薬物の生体利用率(bioavailability)に影響を及ぼすことが報告されている(例えば、Ganapathy, Leibach, Curr.Biol 3: 695-701 (1991); Nakashima et al., Biochem.Pharm. 33: 3345-3352 (1984); Friedman, Amidon, Pharm.Res. 6:1043-1047 (1989); Okano et al., J.Biol.Chem. 261: 14130-14134 (1986); Muranushi et al., Pharm.Res. 6: 308-312 (1989); Friedman, Amidon, J.Control.Res. 13: 141-146 (1990))。ここ数年、ヒトにおける薬物の体内動態変動要因を明らかにする研究が行われており、薬物代謝酵素と同様に薬物トランスポーターも、薬物の体内における作用に影響を及ぼすことが明らかにされてきた。薬物トランスポーターとしては、p-glycoprotein(Annu.Rev.Biochem. 58: 137 (1989))、multidrug re

sistance protein(Science 258: 1650 (1992); Cancer Res. 55: 102 (1995)), lung resistance protein (Ann.Oncol. 7: 625 (1996); Int.J.Cancer 73: 1021 (1997)), organic cation transporter(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91: 133 (1994); Molec.Pharmacol. 51: 913 (1997))等が公知である。これらの薬物トランスポーターについても薬物代謝酵素についてと同様に、SNPs解析が実施されている。近年、機能変化を伴うトランスポーターのSNPsが発見され、個体間変動要因の一つとして注目されている(Ryu S. et al., J.Biol.Chem. 275: 39617-39624 (2000); Tirona R.G. et al., J.Biol.Chem. 276: 35669-35675 (2001))。現在、トランスポーターのSNPsの機能解析は遺伝子を導入した哺乳類細胞を用いるのが主流である。しかし、親株との活性比の低い基質に対しては、SNPsによる機能変化を精度良く検出することは困難と推測される。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況を鑑みてなされたものであり、その目的は、バックグラウンドの低い、目的とするトランスポーター活性を高感度で測定する方法を提供することである。さらに、本発明はそのような方法を用い、トランスポーターのトランスポート活性を阻害または促進する物質をスクリーニングする方法を提供することも目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ウイルスは基本的に自己で増殖する必要がないため、生命維持に必要な物質を取り込む生理的意義は存在しないと推測、ウイルス膜上に内因性トランスポーターは発現していない(或いは、極めて微量な発現)と考えられる点に着目した。膜上に内因性トランスポーターを発現していない出芽バキュロウイルスを用いたトランスポーター活性測定法は、バックグラウンドが低く、目的とする活性を高感度で測定できると考えられた。また、このような方法によりトランスポーターのSNPsによる機能変化をより広範な基質について測定でき、テーラード医療への応用が可能と考えられる。

【0008】

即ち、本発明は、

[1] トランスポーターをコードする遺伝子を含む組換えウイルスを感染させた宿主を培養し、該宿主から放出される出芽ウイルス膜上にトランスポーターを発現させることを特徴とする、トランスポーター活性を有するトランスポーターを発現させる方法、

[2] ウイルスがバキュロウイルスである[1]記載の方法、

[3] トランスポーターが非ウイルス由来である[1]または[2]いずれか記載の方法、

[4] トランスポーターがペプチドトランスポーターである[1]～[3]いずれか記載の方法、

[5] ペプチドトランスポーターがPepT1又はPepT2である[4]記載の方法、

[6] トランスポーター活性を有するトランスポーターを発現しているウイルス、

[7] トランスポーターが非ウイルス由来である[6]記載のウイルス、

[8] ウイルスがバキュロウイルスである[7]記載のウイルス、

[9] ウイルスが出芽ウイルスである[6]～[8]いずれか記載のウイルス、

[10] トランスポーターがペプチドトランスポーターである[6]～[9]いずれか記載のウイルス、

[11] ペプチドトランスポーターがPepT1又はPepT2である[10]記載のウイルス、

[12] ウイルス膜上でトランスポーターを発現させることを特徴とする、トランスポーターの活性測定方法、

[13] ウイルスが出芽バキュロウイルスである[12]記載の方法、

[14] トランスポーターがペプチドトランスポーターである[12]または[13]記載の方法、

[15] トランスポーターがPepT1又はPepT2である[14]記載の方法、

[16] 以下の工程を含むトランスポーターのトランスポート活性を阻害又は促進する物質のスクリーニング方法、

(a) ウイルス膜上にトランスポーターを発現させる工程、

(b) 該トランスポーターに被験物質を接触させる工程、及び

(c) トランスポーター活性を阻害又は促進する物質を選択する工程

[17] ウイルスがバキュロウイルスである [16] 記載の方法、

[18] ウイルスが出芽ウイルスである [16] 又は [17] 記載の方法、

[19] トランスポーターが非ウイルス由来である [16] ～ [18] いずれか記載の方法、

[20] トランスポーターがペプチドトランスポーターである、[16] ～ [19] いずれか記載の方法、

[21] ペプチドトランスポーターが PepT1 又は PepT2 である、[20] 記載の方法、

[22] ウイルスが担体に固定されていることを特徴とする [16] ～ [21] いずれか記載の方法、及び

[23] ウイルスの担体への固定が、ウイルス膜上に発現している膜タンパク質に対する抗体を介して行われていることを特徴とする [22] 記載の方法、

[24] ウイルスの担体への固定が、ウイルス膜上に発現しているタンパク質をビオチン化することでビオチン・ストレプトアビジン反応を介して行われることを特徴とする請求項 22 記載の方法、

を提供するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明は、トランスポーターをコードする遺伝子を含む組換えウイルスを感染させた宿主を培養し、該宿主から放出される出芽ウイルス膜上にトランスポーターを発現させることを特徴とする、トランスポーター活性を有するトランスポーターを発現させる方法に関する。ここで、本発明におけるトランスポーターとしては、例えば、ペプチドトランスポーター、アミノ酸トランスポーター、糖トランスポーター等が挙げられる。より詳細には、表 1 に示されるようなトランスポーターを例示することができる。

【0010】

【表 1】

トランス ポーター	駆動力／輸送 形式	アミノ酸	膜貫通	ncbi	文献
4F2hc	LAT調節因子	529	1	P08195	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 (18), 6526-6530 (1987)
AE4	Cl/HCO交換 輸送	945	14	AAK16733	Commun. 282 (5), 1103-1109 (2001)
ATB ⁰ /AS CT2	Na/中性アミノ 酸共輸送	541	10	Q15758	J. Biol. Chem. 271 (31), 18657-18661 (1996)
ATB ⁰⁺	Na/中性・塩 基性アミノ酸 共輸送	642	12	AAD49223	J. Biol. Chem. 274 (34), 23740-23745 (1999)
BAT1/b ⁰⁺ AT	促進拡散(アミ ノ酸)	487	12	P82251	Nat. Genet. 23 (1), 52-57 (1999)
BCRP	ATP/一次性能 動輸送	655	6	AAC97367	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 (26), 15665-15670 (1998)
BSEP	ATP/一次性能 動輸送	1321	12	AAC77455	Nat. Genet. 20 (3), 233-238 (1998)
BTR1	Cl/HCO交換 輸送	891	14	AAK16734	Commun. 282 (5), 1103-1109 (2001)
CNT1	Na/ヌクレオシ ド共輸送	649	13	NP_004204	Am. J. Physiol. 272 (2), C707-C714 (1997)
CNT2	Na/ヌクレオシ ド共輸送	658	14	O43868	Am. J. Physiol. 273 (6 Pt 2), F1058-F1065 (1997)
CNT3	Na/ヌクレオシ ド共輸送	691	13	NP_071410	J. Biol. Chem. 276 (4), 2914-2927 (2001)
DRA/GLD	Cl/HCO交換 輸送	764		P40879	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (9), 4166-4170 (1993)
EAAC1	Na/酸性アミノ 酸共輸送	525	12	NP_004161	Genomics 20 (2), 335-336 (1994)
ENT1	促進拡散(ヌ クレオシド)	456	14	NP_004946	Nat. Med. 3 (1), 89-93 (1997)
ENT2	促進拡散(ヌ クレオシド)	456	14	AAC39526	Biochem. J. 328 (Pt 3), 739-743 (1997)
FORT	葉酸	591	12	P41440	Commun. 206 (2), 681-687 (1995)
GAT1	Na/GABA共 輸送	599	12	NP_003033	FEBS Lett. 269 (1), 181-184 (1990)
GAT3	Na/GABA共 輸送	632	12	P48066	Recept. Channels 2 (3), 207-213 (1994)
GLUT1	促進拡散(グ ルコース)	492	12	NP_006507	Science 229 (4717), 941-945 (1985)
GLUT2	促進拡散(グ ルコース)	524	12	NP_000331	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (15), 5434-5438 (1988)
GLUT3	促進拡散(グ ルコース)	496	12	NP_008862	J. Biol. Chem. 263, 15245-15248 (1988)
GLUT4	促進拡散(グ ルコース)	509	12	NP_001033	J. Biol. Chem. 264 (14), 7776-7779 (1989)
GLVR1/Pi T-1	Na/Pi共輸送	679	10	NP_005406	Cell Growth Differ. 1 (3), 119-127 (1990)

GLVR2/Pi T-2	Na/Pi共輸送	652	10	NP_006740	J. Virol. 65 (11), 6316-6319 (1991)
LAT1	促進拡散(アミノ酸)	507	12	JG0165	Commun. 255 (2), 283-288 (1999)
LRP	ATP/一次性能動輸送	896		NP_059447	Nat. Med. 1 (6), 578-582 (1995)
MCT1	H/有機アニオン共輸送	500	12	NP_003042	Genomics 23 (2), 500-503 (1994)
MCT2	H/有機アニオン共輸送	478	12	O60669	J. Biol. Chem. 273 (44), 28959-28965 (1998)
MCT3	H/有機アニオン共輸送	465	12	O15427	Biochem. J. 329 (Pt 2), 321-328 (1998)
MCT4	H/有機アニオン共輸送	487	12	O15374	Biochem. J. 329 (Pt 2), 321-328 (1998)
MCT5	H/有機アニオン共輸送	505	12	O15375	Biochem. J. 329 (Pt 2), 321-328 (1998)
MCT6	H/有機アニオン共輸送	523	12	O15403	Biochem. J. 329 (Pt 2), 321-328 (1998)
MDR1	ATP/一次性能動輸送	1279	12	AAB69423	Cell 47 (3), 381-389 (1986)
MDR3	ATP/一次性能動輸送	1279	12	P21439	EMBO J. 6 (11), 3325-3331 (1987)
MRP1	ATP/一次性能動輸送	1531	17	P33527	Science 258 (5088), 1650-1654 (1992)
MRP2	ATP/一次性能動輸送	1545	17	Q92887	Cancer Res. 56 (18), 4124-4129 (1996)
MRP3	ATP/一次性能動輸送	1527	17	NP_003777	Cancer Res. 57 (16), 3537-3547 (1997)
MRP4	ATP/一次性能動輸送	1325	12	NP_005836	Cancer Res. 57 (16), 3537-3547 (1997)
MRP5	ATP/一次性能動輸送	1437	12	O15440	Cancer Res. 57 (16), 3537-3547 (1997)
MRP6	ATP/一次性能動輸送	1503	17	O95255	Cancer Res. 59 (1), 175-182 (1999)
MRP7	ATP/一次性能動輸送	1492	17		Cancer Lett. 162 (2), 181-191 (2001)
NaPi-3B	Na/Pi共輸送	690	8	NP_006415	Commun. 258 (3), 578-582 (1999)
NaSi-1	Na/Si共輸送	595	13	NP_071889	Genomics 70 (3), 354-363 (2000)
NHE1	Na/H交換輸送	815	12	P19634	Cell 56 (2), 271-280 (1989)
NHE2	Na/H交換輸送	812	12	NP_003039	Am. J. Physiol. 40 (2), 383-390 (1999)
NHE3	Na/H交換輸送	834	12	NP_004165	Am. J. Physiol. 269 (1 Pt 1), C198-C206 (1995)
NPT1	Na/Pi共輸送	467	6-8	Q14916	Genomics 18 (2), 355-359 (1993)

NPT2/Na Pi-3	Na/Pi共輸送	639	8	NP_003043	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 5979-5983 (1993)
Nramp2/D CT1	H/Fe共輸送	568	12	P49281	Mol. Immunol. 34 (12-13), 839- 842 (1997)
NTCP2/A SBT	Na/胆汁酸共 輸送	348	7	NP000443	J. Biol. Chem. 270 (45), 27228- 27234 (1995)
OAT1	促進拡散(有 機アニオン)	550	12	NP_004781	Commun. 255 (2), 508-514 (1999)
OAT2	促進拡散(有 機アニオン)	548	12	NP_006663	
OAT3	促進拡散(有 機アニオン)	568	12	NP_004781	Commun. 255 (2), 508-514 (1999)
OAT4	促進拡散(有 機アニオン)	550	12	AAK68155	J. Biol. Chem. 275 (6), 4507- 4512 (2000)
OATP-A	促進拡散(有 機アニオン)	670	12	NP_066580	Gastroenterology 109 (4), 1274- 1282 (1995)
OATP-B	促進拡散(有 機アニオン)	709	12	NP_009187	Commun. 273 (1), 251-260 (2000)
OATP-C	促進拡散(有 機アニオン)	691	12	BAA78639	Commun. 273 (1), 251-260 (2000)
OATP-D	促進拡散(有 機アニオン)	710	12	BAA89287	Commun. 273 (1), 251-260 (2000)
OATP-E	促進拡散(有 機アニオン)	722	12	BAA89288	Commun. 273 (1), 251-260 (2000)
OCT1	促進拡散(有 機カチオン)	554	12	NP_003048	Mol. Pharmacol. 51 (6), 913-921 (1997)
OCT2	促進拡散(有 機カチオン)	555	12	NP_003049	DNA Cell Biol. 16 (7), 871-881 (1997)
OCT3	促進拡散(有 機カチオン)	551	12	NP_035525	Genomics 55 (2), 209-218 (1999)
OCTN1	H/有機カチオ ン	551	11	NP_003050	FEBS Lett. 419 (1), 107-111 (1997)
OCTN2	Na/有機カチ オン共輸送	557	12	O76082	Commun. 246 (3), 589-595 (1998)
PGT	促進拡散(有 機アニオン)	643	12	NP_005612	Commun. 221 (2), 454-458 (1996)
rBAT	BAT1調節因 子	685	1	AAA81778	J. Biol. Chem. 268 (20), 14842- 14849 (1993)
SDCT1/N aDC-1	Na/ジカルボ ン酸共輸送	592	8	NP_003975	Am. J. Physiol. 270 (4 Pt 2), F642-F648 (1996)
SGLT1	Na/グルコー ス共輸送	664	14	NP00334	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (15), 5748-5752 (1989)
SGLT2	Na/グルコー ス共輸送	672	14	NP_003032	Am. J. Physiol. 263 (3 Pt 2), F459-F465 (1992)
SGLT3/S AAT1	Na/グルコー ス共輸送	659	14	P31636	J. Biol. Chem. 268 (3), 1509- 1512 (1993)
SLC26A6	Cl/HCO ₃ 交換 輸送	738	11	NP_075062	Genomics 70 (1), 102-112 (2000)

SVCT1	Na/ビタミンC 共輸送	598	12	NP_005838	Biochim. Biophys. Acta 1461 (1), 1-9 (1999)
UT2	尿素(促進拡 散)	397	10	Q15849	FEBS Lett. 386 (2-3), 156-160 (1996)

【0011】

本発明において、好ましいトランスポーターはペプチドトランスポーターであり、特にPepT1及びPepT2が好ましい。PepT1およびPepT2の塩基配列、アミノ酸配列は既に知られている（ヒトPepT1：GenBank XM_007063、J.Biol.Chem. 270(12)：6456-6463 (1995)；ヒトPepT2：GenBank NP_066568、XM_002922、Biochim.Biophys.Acta. 1235:461-466 (1995)；マウスPepT1：GenBank AF205540、Biochim. Biophys. Acta. 1492: 145-154 (2000)；マウスPepT2：GenBank NM_021301、Biochim. Biophys. Res. Commun. 276: 734-741 (2000)）。しかしながら、本発明のトランスポーターは特にこれらのトランスポーターに限定されず、ウイルス膜上に発現され得るものであればよい。

【0012】

トランスポーターをコードする遺伝子は、例えば、表1に記載のものについては米国バイオテクノロジー情報センター(NCBI)に表記のAccession番号で登録されており、例えば、それらの配列情報を元にcDNAライブラリーやゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。より具体的には、例えば、cDNAまたはゲノムライブラリーをプローブ(目的のトランスポーターに対する抗体、若しくは、標的のトランスポーターをコードする塩基配列に対してハイブリダイズするオリゴヌクレオチド)を用いてスクリーニングする。スクリーニングは例えば、Sambrookらの『Molecular Cloning: A Laboratory Manual』(New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)第10～12章に記載の標準的な手法に従って行うことができる。また、PCR法(前述のSambrookら(1989)の第14章など参照)により目的のトランスポーターをコードする遺伝子を単離することも可能である。

【0013】

トランスポーターのウイルス膜上への発現方法としては、例えば、W098/46777及びLoiselら(T.P.Loisel et al., Nature Biotech. 15: 1300-1304 (1997))の

出芽バキュロウイルスを用いた膜タンパク質の発現方法を挙げることができる。より詳細には、トランスポーターをコードする遺伝子を含む昆虫細胞用の組換えベクターを作製し、バキュロウイルスDNAと共にSf9等の昆虫細胞へ導入する。すると、組換えベクターにコードされるトランスポーターは、感染細胞が死滅する前に感染細胞より細胞外に放出される成熟ウイルス粒子(ピリオン)上に発現され、トランスポーターを発現する組換えウイルスを得ることができる。

【0014】

本発明において、出芽ウイルスとは出芽(budding)により感染細胞から放出されるウイルスのことである。一般に細胞膜を被ったウイルスは細胞が破壊されていない状態でも当該ウイルスに感染した細胞から発芽し、継続的に放出されるのに対し、膜を被らないアデノウイルスや、核膜を被ったヘルペスウイルスは細胞が破壊された時に一斉に放出される。本発明においては、特に出芽ウイルスが好ましい。また、本発明において組換えウイルスを感染させる宿主は、当業者であれば、用いるウイルスの種類に応じて、ウイルスの増殖を可能ならしめる宿主を適宜選択することができる。例えば、バキュロウイルスを用いる場合、Sf9等の昆虫細胞の使用が考えられる。一般に、バキュロウイルス-昆虫細胞を用いたタンパク質発現系は、哺乳動物細胞と同様に脂肪酸アセチル化及び糖鎖付加等の翻訳と同時または翻訳後の修飾が行われること、並びに、哺乳動物細胞系よりも異種タンパク質の発現レベルが高いこと(Luckow V.A. and Summers M.D., Virol. 167: 56 (1988))から有利な系であると考えられている。

【0015】

さらに、本発明により、トランスポーター活性を有するトランスポーターを発現しているウイルスが提供される。ここで、ウイルスとしてはバキュロウイルス、パピローマウイルス、ポリオーマウイルス、SV40(simian virus 40)、アデノウイルス、EBV(Epstein-Bar virus)、レトロウイルス等を挙げることができる。本発明において、特に好ましいウイルスとしては、AcMNPV(Invitrogen)等のバキュロウイルスが挙げられ、また、出芽ウイルスが本発明のウイルスとして好ましい。また、ウイルスにより発現されているトランスポーターは好ましくは非ウイルス由来であり、例えば表1に挙げられるトランスポーターが例示される。中で

も、ペプチドトランスポーターが好ましく、さらに好適にはPept1及びPepT2を挙げることができる。

【 0 0 1 6 】

本発明のトランスポーター活性を有するトランスポーターを発現しているウイルスは、例えば、トランスポーターをコードする遺伝子を含む組換えウイルスを感染させた宿主を培養することによって得ることができる。または、上述のW098/46777及びLoiselら(T.P.Loisel et al., Nature Biotech. 15: 1300-1304 (1997))の方法の様に、トランスポーターをコードする組換えベクターをバキュロウイルスと共に昆虫細胞に導入することにより、細胞外へ放出されるバキュロウイルスの膜上にトランスポーターを発現させることもできる。また、Strehlowら(D.Strehlow et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 97: 4209-4214(2000))の方法のように、トランスポーターをコードする遺伝子を導入したMoloneyウイルス由来ベクターより作製した組換えウイルスをPA317等のパッケージング細胞に感染させることにより、細胞外へ放出されるMoloney murine leukemiaウイルスの膜上にトランスポーターを発現させることができる。しかしながら、本発明のトランスポーター活性を有するトランスポーターを発現しているウイルスは、この方法により調製されたものに限定されず、トランスポーターがウイルス粒子内、または表面に発現されていれば如何なる方法により作製されたウイルスも包含される。

【 0 0 1 7 】

上述のようにして調製された組換えウイルスは、公知の手法により精製することができる。例えば、増加密度勾配遠心法(augment densitygradient centrifugation)(Albrechtsen et al., J.Virological Methods 28: 245-256 (1990); Hewish et al., J.Virological Methods 7: 223-228 (1983))、サイズ排除(size exclusion)クロマトグラフィー(Hjorth and Mereno-Lopez, J.Virological Methods 5: 151-158 (1982); Crooks et al., J.Chrom. 502: 59-68 (1990); Mento S. J. (Viagene, Inc.) 1994 Williamsburg Bioprocessing Conference)、モノクローナル抗体及びフコース硫酸含有多糖類等を利用したアフィニティークロマトグラフィー(Najayou et al., J.Virological Methods 32: 67-77 (1991); Diaco e

t al., J.Gen.Virol. 67: 345-351 (1986); Fowler, J.Virological Methods 11: 59-74 (1986); 特再表97/032010)、DEAEイオン交換クロマトグラフィー(Haruna et al., Virology 13: 264-267 (1961))等がウイルスを精製する方法として知られている。本発明のトランスポーターを発現しているウイルスもこれらに限定されるわけではないが、上述の方法、または、これらの方法を組み合わせて精製しても良い。

【0018】

本発明はまた、ウイルス膜上でトランスポーターを発現させることを特徴とする、トランスポーターの活性測定方法に関する。例えば、出芽バキュロウイルスを用いたトランスポーター活性測定は次のような方法で実施できる。まず、最初に必要であればトランスポーターによりウイルス内に取り込ませる基質を検出可能なように標識する。例えば、放射性物質、蛍光等による標識が考えられる。次に、トランスポーターを発現している出芽バキュロウイルスと基質を混合し、37℃で反応させる。一定時間後、反応液をセルロース膜などのフィルター上に移し、ウイルス内に取り込まれた基質取り込まれなかった基質を吸引濾過法で分離する。あらかじめ氷冷しておいた緩衝液で数回フィルターを洗浄し、フィルターに捕捉されたウイルス中の基質濃度を液体シンチレーションカウンター、蛍光検出器やHPLCなどで定量する。非特異的な取り込みは、トランスポーターを発現していない野生型ウイルスへの基質の取り込みで検出することができる。また、トランスポーターに対する阻害剤を基質と共存させる、あるいは基質が放射性物質の場合は過剰量の非標識体を共存させて取り込み試験を実施することでも非特異的な取り込みを評価できる。また、4℃で取り込み試験を実施し、非特異的な取り込みを評価することもできる。

【0019】

別の方法としては、トランスポーターを発現している出芽バキュロウイルス溶液を96ウェルプレートなどに添加し、4℃で一晩放置し、プレートへのコーティングを行う。または、ウイルス膜上に高発現しているgp64タンパク質などの膜タンパク質に対する抗体を96ウェルプレートなどに添加し、4℃で一晩放置する。その後、トランスポーターを発現している出芽バキュロウイルスをプレートに添

加し、抗gp64抗体(Novagen社、Clontech社)などの膜タンパク質に対する抗体を介してウイルスをプレートにコーティングすることもできる。ウイルスをコーティングしたプレートに基質を添加し、反応を開始する。一定時間後、あらかじめ氷冷しておいた緩衝液でプレートを洗浄し、ウイルスに取り込まれなかった基質を取り除く。ウイルスに取り込まれた基質量を液体シンチレーションカウンター、蛍光検出器やHPLCなどで定量する。プレートへの非特異的吸着が高い場合には、活性測定前にスキムミルクなどでブロッキングを行ってもよい。非特異的な取り込みは、トランスポーターを発現していない野生型ウイルスへの基質の取り込みで検出することができる。また、トランスポーターに対する阻害剤を基質と共存させる、あるいは基質が放射性物質の場合は過剰量の非標識体を共存させて取り込み試験を実施することでも非特異的な取り込みを評価できる。また、4℃で取り込み試験を実施し、非特異的な取り込みを評価することもできる。

【0020】

通常、生体材料や培養細胞から調製した細胞膜小胞などはディープフリーザーあるいは液体窒素中で保存するが、出芽バキュロウイルスは4℃で保存可能であり、特殊な冷凍機器は必要としない。また、細胞培養など煩雑な操作のため、活性測定に電気生理学的手法のような特殊な機器を必要としないため、発芽バキュロウイルス発現系は簡便なトランスポーター活性測定法である。

【0021】

本発明のウイルス膜上でトランスポーターを発現させることを含むトランスポーター活性の測定方法は、トランスポーターの活性を阻害または促進する物質の探索にも応用可能である。特に発芽バキュロウイルス発現系を用いる方法は簡便であり、トランスポーター活性を阻害または促進する物質を同定するに当たっても有用である。本方法においては、具体的には、例えば、目的とするトランスポーターを発現させた出芽バキュロウイルスを作製する。そのトランスポーターの放射性基質あるいは蛍光基質と被験物質を混合し、トランスポーター発現ウイルスへ添加する。基質を添加する前に、化合物をあらかじめウイルスにプレロードすることも可能である。被験物質非存在下での輸送活性を100として、被験物質存在下での活性変化を指標にトランスポーター活性を阻害または促進する物質を

探索する。被験物質がトランスポーター活性を阻害または促進しているか否かの判定は、公知の方法、例えば、放射性物質(^{14}C など)、蛍光物質等で輸送の対象となる基質(例えば、ペプチドトランスポーターの場合にはペプチド)を標識し、該基質がトランスポーター発現ウイルスに取り込まれた量を測定すること等により行うことができる。

【0022】

本発明のトランスポーターのトランスポート活性を阻害または促進する物質のスクリーニング方法における被験物質としては、例えば、精製若しくは粗タンパク質(抗体を含む)、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、合成低分子化合物のライブラリー、ペプチド、非ペプチド性化合物、天然化合物等が挙げられるが、これらに制限されない。

【0023】

ウイルス膜上に発現されたトランスポーターは、例えば、精製したタンパク質の形態、担体に結合させた形態、他のタンパク質との融合タンパク質の形態、または膜画分の形態等で被験物質に接触させることができる。ここでウイルスを固定する担体としては、合成または天然の有機高分子化合物、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭等の無機材料、さらにはこれらの材料に多糖類、合成高分子をコーティングしたもの等を挙げるることができる。有機高分子化合物としては、アガロース、セルロース、キチン、キトサン、セファロース、デキストラン等の多糖類、ポリエステル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリプロピレン、ポリビニルアルコール、ポリアミド、シリコン樹脂、フッ素樹脂、ポリウレタン、ポリアクリルアミド、それらの誘導体を含む多数の化合物を例示することができるが、ウイルスを固定化することができれば特にその組成は制限されるものではないことが理解される。担体の形状にも特に制限はなく、例えば、プレート等の膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状等が挙げられるが、本発明においては、特に市販のプレートへの固定が簡便性の面から好ましい。これらの担体の形状や表面積等を変化させることによって、被験物質との接触面積を制御することがで

きる。ウイルスは、例えば、該ウイルス上に発現している膜タンパク質に対する抗体を介して担体に固定することができる。また、あらかじめビオチン化すればストレプトアビジンやアビジンを介して担体に固定することもできる。

【0024】

トランスポーター活性の阻害剤または促進剤の探索により、トランスポーターの生理的機能を明らかにできると共に、それらの阻害剤及び促進剤を、トランスポーターの異常に起因する疾患に対する医薬品開発において応用することも考えられる。

【0025】

本発明のトランスポーター発現出芽バキュロウイルス又は該ウイルスのトランスポーターを含む膜部分はトランスポーター抗体を作製する際の免疫抗原ならびにスクリーニング抗原として利用可能である。このような抗原の調製は、例えば、バキュロウイルスを用いたW098/46777等の記載の方法に準じて行うことができる。

【0026】

従来、トランスポーターに対する抗体を作成する際には、活性を有するトランスポーターを免疫原とすることは困難であったが、本発明の方法により発現させたトランスポーターはトランスポート活性を有していることが確認されているので、本発明のトランスポーター発現ウイルス又は該ウイルスのトランスポーターを含む膜部分を免疫原として用いれば、活性を有するトランスポーターを免疫原にすることが可能となる。

【0027】

よって、本発明のトランスポーター発現ウイルス又は該ウイルスのトランスポーターを含む膜部分を免疫原として抗体を作成することは非常に有用である。

従って、本発明は、トランスポーター発現出芽ウイルス又は該ウイルスのトランスポーターを含む膜部分を免疫抗原とすることを特徴とする抗トランスポーター抗体の作製方法、及び該方法により作製された抗体を提供する。

【0028】

本発明のトランスポーター抗体の作製は、トランスポーター発現ウイルス又は

該ウイルスのトランスポーターを含む膜部分を皮下または腹腔内注射等により非ヒト哺乳動物に複数回投与することにより、当業者に周知の方法で作製することができる。

【0029】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えば、サルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

【0030】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。一般的方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、感作抗原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4～21日毎に数回投与することが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

【0031】

ここで、本発明のトランスポーターに対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。例えば、本発明のトランスポーターをカップリングさせたアフィ

ニティーカラムを用いて、本発明のトランスポーターのみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテインAあるいはプロテインGカラムを利用して精製することにより、免疫グロブリンGあるいはMを調製することができる。

【0032】

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。

【0033】

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）に培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続して行う。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

【0034】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球をin vitroで本発明のトランスポーター発現ウイルス又は該ウイルスのトランスポーターを含む膜部分で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、トランスポーターへの結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688号公報）。

【0035】

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水

を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のトランスポーターをカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明のトランスポーターの精製、検出に用いられる他、本発明のトランスポーターのアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、この抗体を本発明のトランスポーターが関与する疾患の抗体治療へ応用することも考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

【0036】

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるトランスポーター発現ウイルス又は該ウイルスのトランスポーターを含む膜部分を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いてトランスポーターに結合するヒト抗体を取得することができる（国際公開番号W092-03918、W093-22877、W094-02602、W094-25585、W096-33735およびW096-34096参照）。

【0037】

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子(oncogene)により不死化させた細胞を用いてもよい。

【0038】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

【0039】

さらに、本発明の抗体は、本発明のポリペプチドに結合する限り、その抗体断

片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

【 0 0 4 0 】

抗体修飾物として 水溶性ポリグリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

【 0 0 4 1 】

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR（相補性決定領域）とヒト抗体由来のFR（フレームワーク領域）及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

【 0 0 4 2 】

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で用いられる抗体の分離、精製は通常の方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Antibod

ies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)等により行うことができる。

【0043】

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia)等が挙げられる。

【0044】

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

【0045】

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明のトランスポーターを添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーションし、次いで洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia製)を使用することができる。

【0046】

トランスポーター結合抗体のスクリーニングは出芽バキュロウイルスをコーテ

ィングした96ウェルプレートを用いてELISAにより行うことができる。ウイルス抗原に対する抗体は野生型ウイルスをスクリーニング抗原としたELISAで除くことができる。あるいは、ハイブリドーマ培養上清と野生型ウイルスを反応させ、ウイルス抗原に対する抗体をあらかじめ除いた後に、トランスポーター発現ウイルスをスクリーニング抗原としたELISAを行い、トランスポーターの結合抗体を取得することもできる。結合抗体の中から、機能阻害抗体のスクリーニングも可能である。即ち、目的とするトランスポーターの放射性基質あるいは蛍光基質とハイブリドーマ培養上清など抗体を含む溶液を混合し、トランスポーター発現ウイルスへ添加する。基質を添加する前に、ハイブリドーマ培養上清などの抗体を含む溶液をあらかじめウイルスにプレロードすることも可能である。抗体非存在下での輸送活性を100として、抗体存在下での活性低下を指標に機能阻害抗体をスクリーニングすることができる。トランスポーターに対する結合抗体により、トランスポーターの組織分布を細胞レベルで明らかにできる。また、機能阻害抗体は培養細胞に添加する、あるいは実験動物に投与することでトランスポーターの生理的機能の解明に大きく貢献できる。また、疾患に関連するトランスポーターに対する結合抗体や機能阻害抗体は、医薬品として応用することも考えられる。

【 0 0 4 7 】

本発明は、SNPsなどの多型や変異などによるアミノ酸配列の変化により、トランスポーターの活性がどのように変化するかの評価などにも利用することが可能である。例えば、OATP-Cでは多数のSNPsが存在し、これらのSNPsによりアミノ酸配列が変化していることが報告されている(J. Biol. Chem., 276, (2001))。これらアミノ酸の変化したOATP-Cのそれぞれについて本発明の方法によりトランスポーター活性を測定すれば、トランスポート活性に影響を与えるSNPsを同定することや、活性の高いトランスポーターをスクリーニングすることなどを行うことが可能である。

【 0 0 4 8 】

又、トランスポーターのアミノ酸配列を人為的に置換、挿入、欠失、付加などして変異体を作成した後に、該トランスポーターの活性を測定して、活性の高い

トランスポーターをスクリーニングすることや、トランスポート活性に影響を与える領域を同定することも可能である。アミノ酸を置換したトランスポーターの調製は当業者によく知られた方法を用いることができ、例えば、部位特異的変異誘発法(Hashimoto-Gotoh, T. et al., Gene, 152, 271-275, (1995)、Zoller, M J, and Smith, M., Methods Enzymol, 100, 468-500, (1983)、Kramer, W et al., Nucleic Acids Res, 12, 9441-9456, (1984)、Kramer, W and Fritz, HJ., Method Enzymol, 154, 350-367, (1987)、Kunkel, TA., Proc Natl Acad Sci USA, 82, 488-492, (1985)、Kunkel, TA., Methods Enzymol, 85, 2763-2766, (1988))などを用いることができる。

【 0 0 4 9 】

さらに、本発明を用いれば、トランスポーターにより輸送される物質を被験物質として、トランスポート活性を測定することにより、トランスポーターにより輸送されやすい物質、又は輸送されにくい物質をスクリーニングすることも可能である。

【 0 0 5 0 】

本発明はトランスポーター以外のタンパク質においても利用でき、例えば、ナトリウムチャンネル、カルシウムチャンネル、カリウムチャンネル、クロライドチャンネル、陽イオンチャンネル、陰イオンチャンネルなどのイオンチャンネル (ion channel)、などにおいても同様の活性測定方法、スクリーニング方法などを行うことが可能である。この場合、トランスポーターの代わりにチャンネルをウイルス膜上に発現させ、基質としてはチャンネルが透過する物質を用いることができる。本発明に用いるチャンネルとしては、例えば、表 2 に記載のチャンネルを用いることができる。

【 0 0 5 1 】

本発明は上記トランスポーター、イオンチャンネル以外にも、G プロテイン共役型受容体(GPCR: G protien coupled receptor)にも応用することが可能である。

【 0 0 5 2 】

【表 2】

Symbol	Name	Sequence ID
ACCN1	amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal (degenerin)	NM_001094
ACCN2	amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal	NM_001095 NM_020039
ACCN3	amiloride-sensitive cation channel 3, testis	NM_004769 NM_020321 NM_020322
AQP1	aquaporin 1 (channel-forming integral protein, 28kD)	NM_000385
ASIC4	putative acid-sensing ion channel	NM_018674
CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	NM_000068 NM_023035
CACNA1B	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1B subunit	NM_000718
CACNA1C	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	NM_000719
CACNA1D	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	NM_000720
CACNA1E	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1E subunit	NM_000721
CACNA1F	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1F subunit	NM_005183
CACNA1G	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit	NM_018896
CACNA1H	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1H subunit	NM_021098
CACNA1I	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1I subunit	NM_021096
CACNA1S	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit	NM_000069
CACNA2D	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	NM_000722
CACNA2D	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	NM_006030
CACNB1	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	NM_000723
CACNB2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	NM_000724
CACNB3	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit	NM_000725
CACNB4	calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	NM_000726
CACNG1	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 1	NM_000727
CACNG2	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 2	NM_006078
CACNG3	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 3	NM_006539
CACNG4	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4	NM_014405
CACNG5	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5	NM_014404
CACNG6	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	NM_031897
CACNG7	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 7	NM_031896
CACNG8	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 8	AF288388
CLCA1	chloride channel, calcium activated, family member 1	NM_001285
CLCA2	chloride channel, calcium activated, family member 2	NM_006536
CLCA3	chloride channel, calcium activated, family member 3	NM_004921
CLCA4	chloride channel, calcium activated, family member 4	NM_012128
CLCN1	chloride channel 1, skeletal muscle (Thomsen disease, autosomal dominant)	NM_000083
CLCN2	chloride channel 2	NM_004366
CLCN3	chloride channel 3	NM_001829
CLCN4	chloride channel 4	NM_001830
CLCN5	chloride channel 5 (nephrolithiasis 2, X-linked, Dent disease)	NM_000084
CLCN6	chloride channel 6	NM_001286 NM_021735 NM_021736 NM_021737

CLCN7	chloride channel 7	NM_001287
CLCNKA	chloride channel Ka	NM_004070
CLCNKB	chloride channel Kb	NM_000085
CLIC1	chloride intracellular channel 1	NM_001288 NM_001288
CLIC2	chloride intracellular channel 2	NM_001289
CLIC3	chloride intracellular channel 3	NM_004669
CLIC4	chloride intracellular channel 4	NM_013943
CLIC5	chloride intracellular channel 5	NM_016929
CLIC6	chloride intracellular channel 6	BG184920
CLNS1A	chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A	NM_001293
CNGA1	cyclic nucleotide gated channel alpha 1	NM_000087
CNGA3	cyclic nucleotide gated channel alpha 3	NM_001298
CNGB1	cyclic nucleotide gated channel beta 1	NM_001297
CNGB3	cyclic nucleotide gated channel beta 3	NM_019098
DKFZP43	potassium channel modulatory factor	NM_020122
ECAC1	epithelial calcium channel 1	NM_019841
ECAC2	epithelial calcium channel 2	AJ243501 AJ243500
HCN2	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2	NM_001194
HCN4	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4	NM_005477
SCN3B	voltage-gated sodium channel beta-3 subunit (scn3b gene)	NM_018400
HSA27228	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta 3 subunit	NM_018398
KCNA1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1 (episodic ataxia with myokymia)	NM_000217
KCNA10	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 10	NM_005549
KCNA2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2	NM_004974
KCNA3	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3	NM_002232
KCNA4	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 4	NM_002233
KCNA5	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	NM_002234
KCNA6	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 6	NM_002235
KCNA7	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 7	NM_031886
KCNAB1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1	NM_003471
KCNAB2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2	NM_003636
KCNAB3	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 3	NM_004732
KCNB1	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1	NM_004975

KCNB2	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 2	NM_004770
KCNC1	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 1	NM_004976
KCNC3	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 3	NM_004977
KCNC4	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 4	NM_004978
KCND1	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 1	NM_004979
KCND2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2	NM_012281
KCND3	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3	NM_004980
KCNE1	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1	NM_000219
KCNE1L	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1-like	NM_012282
KCNE2	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 2	NM_005136
KCNE3	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	NM_005472
KCNF1	potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1	NM_002236
KCNG1	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1	NM_002237
KCNG2	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 2	NM_012283
KCNH1	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 1	NM_002238
KCNH2	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2	NM_000238
KCNH3	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 3	AB033108
KCNH4	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 4	NM_012285
KCNH5	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 5	U69185
KCNIP1	Kv channel-interacting protein 1	NM_014592
KCNIP2	Kv channel-interacting protein 2	NM_014591
KCNJ1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	NM_000220
KCNJ10	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 10	NM_002241
KCNJ11	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11	NM_000525
KCNJ12	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	NM_021012
KCNJ13	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13	AJ007557
KCNJ14	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 14	NM_013348
KCNJ15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15	NM_002243
Symbol	Name	Sequence ID
KCNJ16	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16	NM_018658
KCNJ2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	NM_000891
KCNJ3	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	NM_002239
KCNJ4	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4	NM_004981
KCNJ5	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	NM_000890

KCNJ6	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6	NM_002240
KCNJ8	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	NM_004982
KCNJ9	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9	NM_004983
KCNJN1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, inhibitor 1	NM_002244
KCNK1	potassium channel, subfamily K, member 1 (TWIK-1)	NM_002245
KCNK10	potassium channel, subfamily K, member 10	NM_021161
KCNK12	potassium channel, subfamily K, member 12	NM_022055
KCNK13	potassium channel, subfamily K, member 13	NM_022054
KCNK2	potassium channel, subfamily K, member 2 (TREK-1)	AF004711
KCNK3	potassium channel, subfamily K, member 3 (TASK-1)	NM_002246
KCNK4	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily K, member 4	NM_016611
KCNK5	potassium channel, subfamily K, member 5 (TASK-2)	NM_003740
KCNK6	potassium channel, subfamily K, member 6 (TWIK-2)	NM_004823
KCNK7	potassium channel, subfamily K, member 7	NM_005714
KCNK9	potassium channel, subfamily K, member 9 (TASK-3)	NM_016601
KCNMA1	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	NM_002247
KCNMB1	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1	NM_004137
KCNMB2	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 2	NM_005832
KCNMB3	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M beta member 3	NM_014407
KCNMB3L	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 3-like	NM_014406
KCNMB4	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	NM_014505
KCNN1	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 1	NM_002248
KCNN2	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2	NM_021614
KCNN3	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3	NM_002249
KCNN4	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4	NM_002250
KCNQ1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member	NM_000218
KCNQ2	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member	NM_004518
KCNQ3	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member	NM_004519
KCNQ4	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member	NM_004700
KCNQ5	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member	NM_019842
KCNS1	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 1	NM_002251
KCNS2	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 2	AB032970
KCNS3	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 3	NM_002252
KIAA0439	homolog of yeast ubiquitin-protein ligase Rsp5; potential epithelial sodium channel regulator	AB007899

KIAA1169	two-pore channel 1, homolog	NM_017901
KV8.1	neuronal potassium channel alpha subunit	NM_014379
LOC64181	two pore potassium channel KT3.3	NM_022358
OTRPC4	vanilloid receptor-related osmotically activated channel; OTRPC4 protein	NM_021625
P2RX1	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	NM_002558
P2RX2	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2	NM_012226 NM_016318
P2RX3	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 3	NM_002559
P2RX4	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4	NM_002560
P2RX5	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	NM_002561
P2RX7	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7	NM_002562
SCN10A	sodium channel, voltage-gated, type X, alpha polypeptide	NM_006514
SCN11A	sodium channel, voltage-gated, type XI, alpha polypeptide	AF188679
SCN12A	sodium channel, voltage-gated, type XII, alpha polypeptide	NM_014139
SCN1A	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha polypeptide	AF225985
SCN1B	sodium channel, voltage-gated, type I, beta polypeptide	NM_001037
SCN2A2	sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 2 polypeptide	NM_021007
SCN2B	sodium channel, voltage-gated, type II, beta polypeptide	NM_004588
SCN3A	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha polypeptide	AF225987
SCN4A	sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha polypeptide	NM_000334
SCN5A	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha polypeptide (long (electrocardiographic) QT syndrome 3)	NM_000335
SCN6A	sodium channel, voltage-gated, type VI, alpha polypeptide	NM_002976
SCN8A	sodium channel, voltage-gated, type VIII, alpha polypeptide	NM_014191
SCN9A	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha polypeptide	NM_002977
SCNN1A	sodium channel, nonvoltage-gated 1, alpha	NM_001038
SCNN1B	sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta (Liddle syndrome)	NM_000336
SCNN1D	sodium channel, nonvoltage-gated 1, delta	NM_002978
SCNN1G	sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma	NM_001039
TALK-1	pancreatic 2P domain potassium channel TALK-1	NM_032115
TASK-4	potassium channel TASK-4; potassium channel TALK-2	NM_031460
TRPC1	transient receptor potential channel 1	NM_003304
TRPC2	transient receptor potential channel 2	X89067
TRPC3	transient receptor potential channel 3	NM_003305
TRPC4	transient receptor potential channel 4	NM_016179
TRPC5	transient receptor potential channel 5	NM_012471
TRPC6	transient receptor potential channel 6	NM_004621
TRPC7	transient receptor potential channel 7	NM_003307
VDAC1	voltage-dependent anion channel 1	NM_003374
VDAC1P	voltage-dependent anion channel 1 pseudogene	AJ002428
VDAC2	voltage-dependent anion channel 2	NM_003375
VDAC3	voltage-dependent anion channel 3	NM_005662
trp7	putative capacitative calcium channel	NM_020389

【0053】

【実施例】

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例

によりいかなる意味でも限定されるものではない。

[実施例 1]

1. PepT1発現出芽バキュロウイルスの調製

ヒト腎臓ライブラリーからPCRを用いて完全長のPepT1遺伝子を単離した。完全長のヒトPepT1遺伝子をpBlueBacHis2A (Invitrogen) に挿入することでトランスファクターpBlueBacHis-PepT1を作製した後、Bac-N-Blue transfection kit (Invitrogen) を用いてBac-N-Blue DNAと共にトランスファクターをSf9細胞に導入することでヒトPepT1発現用組換えウイルスを調製した。即ち、4 μ gのpBlueBacHis-PepT1をBac-N-Blue DNAに加え、さらに1mLのGrace's培地(GIBCO) 20 μ LのCell FECTIN試薬を加え、混和し、室温で15分間静置した後、Grace's培地で1回洗浄した 2×10^6 個のSf9細胞に滴下した。室温で4時間静置した後、さらに2 mLの完全培地(10%ウシ胎児血清(Sigma社製)、100units/mLのペニシリン、及び100 μ g/mLストレプトマイシン(GIBCO-BRL社製)を含むGrace's培地)を加え、27°Cで培養した。相同組換えにより作製されたヒトPepT1発現用組換えウイルスはキット添付の指示書に従い二度の純化を行った後、組換えウイルスのウイルスストックを得た。

【0054】

ヒトPepT1を発現する発芽型ウイルスの調製は以下のようにして行った。すなわち、上記により調製した組換えウイルスをMOI=5となるように500mLのSf9細胞(2×10^6 /mL)に感染させた。27°Cで3日間培養した後、培養液を800×gで15分間遠心分離し、細胞ならびに細胞破砕物を除去した。遠心分離により回収した上清は45,000×gで30分間遠心した後、沈殿物をPBSに懸濁し、さらに800×gで15分遠心することで細胞成分を除去した。上清は再度45,000×gで30分間遠心した後、沈殿物をPBSに再懸濁したものを発芽型ウイルス画分とした。ウイルスならびにSf-9細胞膜上でのPepT1発現は抗His抗体を用いたウエスタン解析で確認した。また、タンパク質濃度はDc Protein Assay kit (Bio-Rad) を用い、BSAを標準物として測定した。

【0055】

2. PepT1機能解析

[^{14}C] グリシルザルコシンを終濃度50 μM になるようにHBSS(pH6.0)で希釈し、基質溶液とした。ウイルス溶液40 μL (100 μg 蛋白)を37°Cで30分間ブレインキュベートし、あらかじめ37°Cで加温していた基質溶液を160 μL 添加し、反応を開始した。1分後、氷冷していたHBSS(pH7.4)(以下、「反応停止液」と略す)を1mL添加して、反応を停止させた。直ちにウイルスを含む反応液を混合セルロース膜フィルターを用いて吸引濾過し、5mLの反応停止液で2回洗浄した。膜フィルターを液体シンチレーターバイアルに移し、クリアゾルIを5mL添加してフィルターを溶解した。溶解後、液体シンチレーションカウンターでフィルター上の放射能を計測した。ウイルス溶液に基質溶液を添加する前に反応停止液を添加した系についても同様にフィルターへの非特異的吸着を計測し、得られた値を各実験の数値から差し引いた。

【0056】

N末端にHis-tagを付加したPepT1発現ウイルスでのPepT1活性を図1に示した。PepT1を発現していない野生型ウイルスに比べて、約7倍の活性比でPepT1活性を検出することができた。

【0057】

[実施例 2]

1. PepT2発現出芽バキュロウイルスの調製

ヒト腎臓ライブラリーから完全長PepT2遺伝子を単離した。完全長のヒトPepT2をコードする遺伝子は、PCRを用いてpBlueBacHis2A (Invitrogen) に組み込むことで完全長のPepT2トランスファーベクター(pBlueBac)を作製し、ウイルスDNAと共にSf-9細胞に導入した。相同組換えにより作製された組換えウイルスを純化した後、組換えウイルス高活性ストックを作製した。ストックウイルスをSf-9細胞に感染させ、一定期間培養後にウイルスならびにSf-9細胞膜上へのPepT2の発現を行った。ウイルスならびにSf-9細胞膜上でのPepT2発現は抗His抗体を用いたウェスタン解析で確認した。より詳細には、PepT2遺伝子を用いた以外は、実施例1に記載の方法に従って操作を行った。

【0058】

2. PepT2機能解析

[³H] グリシルザルコシンを終濃度0.8 μ MになるようにHBSS(pH6.0)で希釈し、基質溶液とした。ウイルス溶液40 μ L(100 μ g蛋白)を37℃で30分間プレインキュベートし、予め37℃で加温していた基質溶液を160 μ L添加し、反応を開始させた。1分後、反応停止液1mLを添加して、反応を停止させた。直ちにウイルスを含む反応液を混合セルロース膜フィルターを用いて吸引濾過し、5mLの反応停止液で2回洗浄した。膜フィルターを液体シンチレーションバイアルに移し、クリアソルIを5mL添加してフィルターを溶解させた。溶解後、液体シンチレーションカウンターでフィルター上の放射能を計測した。ウイルス溶液に基質溶液を添加する前に反応停止液を添加して同様の操作を行い、フィルターへの非特異的吸着を計測し値を各実験の数値から差し引いた。

【0059】

N末端にHis-tagを付加したPepT2発現ウイルスでのPepT2活性を図2に示した。PepT2を発現していない野生型ウイルスに比べて、約9倍の活性比でPepT2活性を検出することができた。

【0060】

【発明の効果】

本発明により提供されるトランスポーター活性を有するトランスポーターを発現しているウイルスを用いることにより、従来よりも低いバックグラウンドでトランスポーターの活性を高感度で測定することができる。従って、本方法を採用することによりトランスポーターの輸送基質の同定、駆動力の同定、及びキネティクス解析等の機能解析を従来と比べ、より簡便に、そして正確に行えると期待される。また、該ウイルスを用いてウイルス膜上に発現されるトランスポーターのトランスポート活性を阻害または促進する物質のスクリーニングを行うことも可能である。トランスポーターは細胞内への薬剤の輸送にも関与していることが報告されていることから、疾患に関連するトランスポーターの活性を阻害または促進する物質は、新しい医薬品の候補となり得る。また、本方法をトランスポーターをコードする遺伝子におけるSNPs解析に用いることにより、トランスポーターのSNPsによる機能変化をより広範な基質について測定でき、各個体についての薬物への応答を解析できることから、テーラーメイド医療への応用が可能である

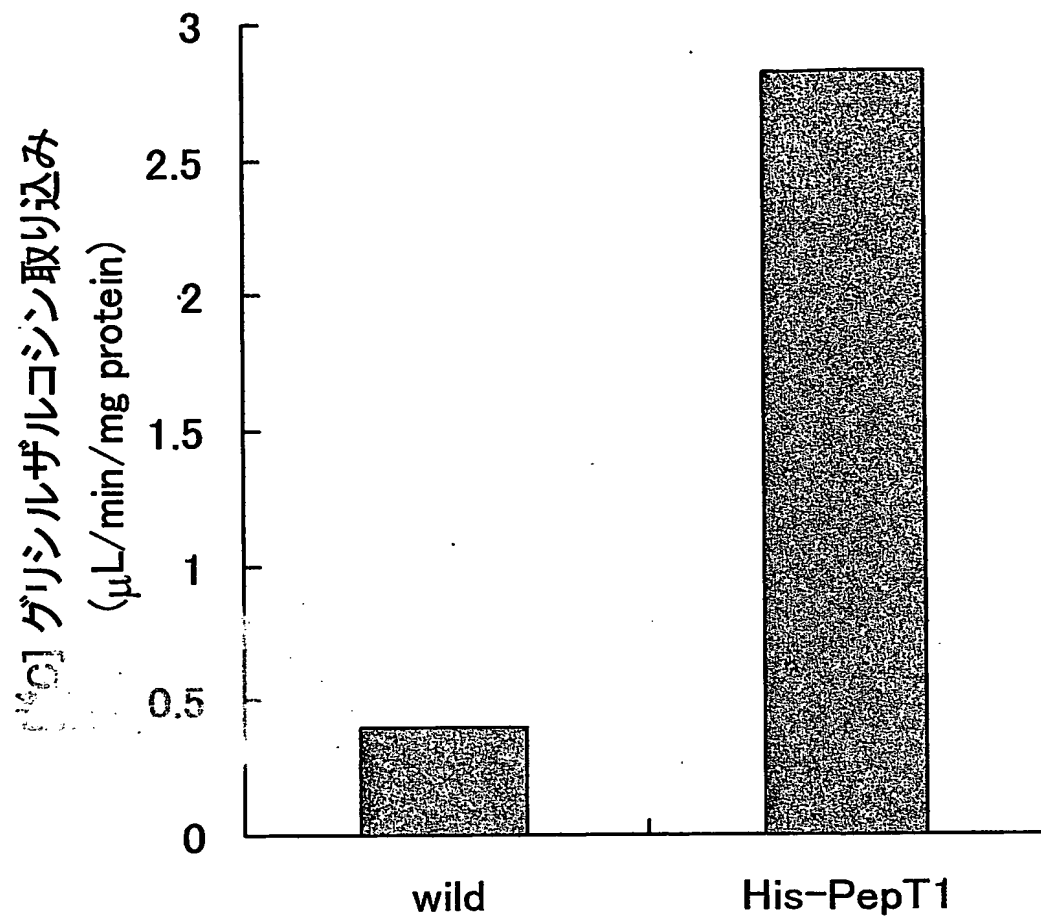
【図面の簡単な説明】

【図 1】 PepT1発現ウイルスにおけるPepT1活性を示すグラフである。ウイルス膜上のPepT1活性は、ウイルスの $[^{14}\text{C}]$ グリシルザルコシンの取り込み量として測定した。「wild」は野生型のウイルスによる取り込み量を示し、「His-PepT1」はN末端にHis-tagを付加したPepT1発現ウイルスによる取り込み量を示す。

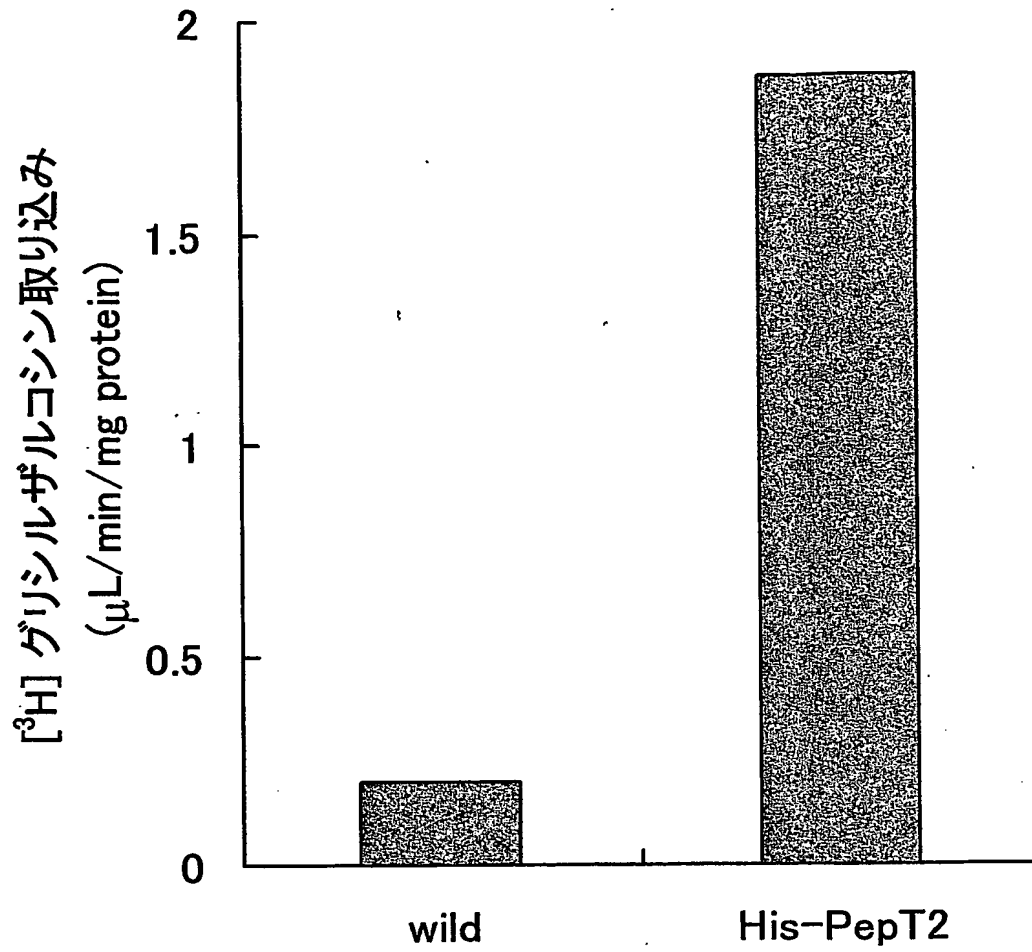
【図 2】 PepT2発現ウイルスにおけるPepT2活性を示すグラフである。ウイルス膜上のPepT2活性は、ウイルスの $[^3\text{H}]$ グリシルザルコシンの取り込み量として測定した。「wild」は野生型のウイルスによる取り込み量を示し、「His-PepT2」はN末端にHis-tagを付加したPepT2発現ウイルスによる取り込み量を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 バックグラウンドの低い、目的とするトランスポーター活性を高感度で測定する方法を提供することである。

【解決手段】 膜上に内因性トランスポーターを発現していない出芽バキュロウイルスを用いたトランスポーター活性測定法は、バックグラウンドが低く、目的とする活性を高感度で測定できると考えられた。また、このような方法によりトランスポーターのSNPsによる機能変化をより広範な基質について測定でき、テラメイド医療への応用が可能である。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
 【整理番号】 C1-A0206
 【提出日】 平成14年 4月23日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【事件の表示】

【出願番号】 特願2002- 96038

【補正をする者】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会
社内

【氏名】 齋藤 良一

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会
社内

【氏名】 大友 俊彦

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会
社内

【氏名】 土屋 政幸

【その他】 本補正書で補正する理由は、発明者の氏名を、「齋藤良一」と記載すべきところを出願時に誤って「斎藤良一」にしてしまった為であります。

【ブルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-096038
受付番号	50200590652
書類名	手続補正書
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成14年 4月30日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】

000003311

【住所又は居所】

東京都北区浮間5丁目5番1号

【氏名又は名称】

中外製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6

階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日	1990年 9月 5日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名	中外製薬株式会社